

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie
der Freien Universität Berlin
Arbeitsgruppe Professor Dr. H. - H. Frey

Versuche über die antikonvulsive Wirkung von Trimethadion an der Maus bei Dauerbehandlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd-Harald Kretschmer
Tierarzt aus Kolberg/Pommern

1971
Journal-Nr. 733

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie
der Freien Universität Berlin
Arbeitsgruppe Professor Dr. H. - H. Frey

Versuche über die antikonvulsive Wirkung von Trimethadion an der Maus bei Dauerbehandlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd-Harald Kretschmer
Tierarzt aus Kolberg/Pommern

1971
Journal-Nr. 733

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. J. B o c h
Referent: Prof. Dr. H.- H. F r e y
Korreferent: Prof. Dr.Dr.Dr. G. S c h ü t z l e r

Tag der Promotion: 11. Februar 1971



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	4
B. Schrifttum	5
1. Allgemeine Einführung in die Pharmakologie der Antikonvulsiva	5
2. Spezielle Pharmakologie von Trimethadion	9
3. Pharmakologische Modelle zur Prüfung antikonvulsiver Wirkungen	13
C. Eigene Versuche	15
1. Methodik	15
a) Krampftest mit Pentylentetrazol	
b) Akute ED_{50} -Bestimmung	
c) Dauerversuche	
d) Versuche zur Bestimmung der Serumkonzentration von Trimethadion und Dimethadion	
2. Ergebnisse	19
a) Akute Versuche	
b) Versuche mit laufender Zufuhr von Trimethadion über das Trinkwasser	
c) Bestimmungen der akuten ED_{50} von Trimethadion nach Behandlung über das Trinkwasser	
D. Diskussion der Ergebnisse	27
E. Zusammenfassung	32
F. Literaturverzeichnis	33

A. Einleitung und Fragestellung

In vorhergehenden Arbeiten (FREY und SCHULZ 1970) ist die schnelle Demethylierung von Trimethadion zu Dimethadion sowohl an Hunden als auch an Mäusen nachgewiesen worden. Während der chronischen Behandlung mit Trimethadion kommt es zur Kumulation des Metaboliten. Da die antikonvulsive Wirksamkeit von Dimethadion fast genauso groß ist wie diejenige von Trimethadion (FREY 1969), wurde die Serumkonzentration von Dimethadion als Parameter für den klinischen antikonvulsiven Effekt angesehen (JENSEN 1962).

Klinische Behandlungen haben gezeigt, daß nur dann die Kontrolle über die Petit mal Epilepsie und eine Normalisierung des EEG erreicht werden konnten, wenn Trimethadion über mindestens 3 Tage p.o. gegeben wurde (GOODMAN et al. 1946). Die dem therapeutischen Erfolg vorausgehende Latenzzeit wurde für notwendig gehalten, dem Metaboliten ausreichend Zeit zu geben, im Organismus zu kumulieren.

In Experimenten mit Mäusen dagegen, bei denen der Pentetrazolkrampf-Test als Modell für die Petit mal Epilepsie durchgeführt wurde (SWINYARD et al. 1952), zeigten die Tiere bereits bei akuten Dosen von Trimethadion einen deutlichen Schutzeffekt, wobei der größte Teil der wirksamen Substanz, eine Stunde nach Injektion, in der unveränderten Form vorlag (FREY 1969).

Die Diskrepanz zwischen klinischen Erfahrungen und tierexperimentellen Ergebnissen mit Trimethadion führte zu der Fragestellung, ob Mäuse, die über längere Zeit mit Trimethadion im Trinkwasser behandelt werden, einen deutlichen Schutzeffekt gegen Pentetrazol zeigen und gegebenenfalls, welche wirksamen Trimethadion-Mengen dazu benötigt werden. Außerdem war das Serumkonzentrationsverhältnis von Trimethadion und Metabolit im akuten oralen Versuch und nach Dauerbehandlung von Interesse.

B. Schrifttum

1. Allgemeine Einführung in die Pharmakologie der Antikonvulsiva

Die Epilepsie ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen, die anfallweise, mit mehr oder weniger starken motorischen Bewegungen und Bewußtseinsveränderungen verbunden, auftreten.

Die Ursache liegt in einer gestörten Funktion der Ganglienzellen, wobei u.a. das Fehlen hemmender postsynaptischer Potentiale, veränderte Aktionspotentiale und die gleichzeitige Entladung benachbarter Nervenzellen die Krämpfe induzieren (TOMAN 1970).

Nach MUMENTHALER (1969) kann man die Epilepsie in 3 Hauptgruppen einteilen. Dabei ist die Grand mal Epilepsie von den fokalen Epilepsien und der Petit-mal-Trias zu unterscheiden.

Der Grand mal - Anfall beginnt mit einem tonischen Krampf, der in klonische Zuckungen übergeht. Danach folgt Bewußtlosigkeit, Erholungsphase und Normalzustand. Auf dem EEG sind über allen Ableitungen gleichzeitig hohe Krampfpotentiale zu sehen.

Die Ursache der fokalen oder symptomatischen Epilepsien liegt meist in einer morphologisch erfaßbaren Veränderung des ZNS (Mißbildung, Traumen, Entzündungen, Tumoren etc.). Neben der JACKSON-Epilepsie ist die psychomotorische Epilepsie (Schläfenlappenepilepsie) am bekanntesten. Sie besitzt ein sehr unterschiedliches Krankheitsbild. Je nach Symptomen werden autonome, motorische, sensorische oder psychomotorische Formen unterschieden. Eine Ableitung über dem Schläfenlappen zeigt auf dem EEG meist hohe Theta- und Deltawellen mit steilen Krampfpotentialen.

Die Abszenenepilepsie wird, zusammen mit dem Propulsiv- und Impulsiv-petit-mal (myoklonische Epilepsie), zu der Petit-mal-Trias zusammengefaßt. Die Abszenenepilepsie, auch eigentliches Petit mal genannt, tritt meist bei Kindern auf und ist durch kurzdauernde Bewußtseinsstörungen und schwache motorische

(symmetrisch klonische) Bewegungen von Mund, Zunge und Finger gekennzeichnet. Die auf dem EEG in allen Ableitungen aufgezeichneten 3 - 4/sec Spikes und Waves sind typisch.

Da die einzelnen Epilepsieformen sehr unterschiedliche Ursachen haben, sind auch die Angriffspunkte der Antikonvulsiva verschieden. TOMAN (1970) unterscheidet:

1. Wirkung auf Krampfherde, die nicht auf veränderte Neuronen zurückzuführen sind (z.B. durch Ischämie),
2. Wirkung auf pathologisch veränderte Neuronen zur Unterdrückung heftiger Entladungen und
3. Schutz der gesunden Neurone vor Reizimpulsen von Krampfherden.

Nach dem letztgenannten Prinzip dürfte der größte Teil der Antiepileptika wirken. Die dabei auftretenden physiologischen und biochemischen Vorgänge sind nur unzureichend bekannt. Sie könnten in einer Hemmung der posttetanischen Potenzierung (PTP), einer Anhebung der synaptischen Erregungsschwelle, einer Verstärkung prä- und postsynaptischer Hemmungen oder in einer Verlängerung der Refraktärzeit liegen.

Nach WOODBURY und KEMP (1970) hat Diphenylhydantoin Einfluß auf den Elektrolyten-Stoffwechsel. Es steigert den Na^+ -Transport durch die Zellmembran und führt zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und zur Abschwächung der posttetanischen Potenzierung. Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus könnte auch bei den Barbituraten und den Oxazolindindionen vorliegen.

Wie die Übersichtstabelle der Antikonvulsiva zeigt, unterscheidet man 5 Wirkstoffgruppen. Phenobarbital ist zwar das wirksamste und am meisten benutzte Antikonvulsivum, aber wegen seiner sedativen Wirkung nur vorsichtig anzuwenden. Die anderen antikonvulsiven Barbiturate haben schwächere krampfhemmende und sedative Wirkung (DRIESEN und HÄRTFELDER 1968, TOMAN 1970). Primidon wirkt außer gegen Grand mal auch gegen die psychomotorische Epilepsie. Im Tierexperiment zeigen die Barbiturate eine gute Schutzwirkung gegen elektrisch

und chemisch erzeugte Krämpfe (SWINYARD et al. 1952). Diphenylhydantoin zeichnet sich durch eine gute Schutzwirkung gegen Grand mal und den maximalen Elektroschock aus, zeigt aber keine Schutzwirkung gegen Pentetrazolkrämpfe und den minimalen Elektroschock (SWINYARD et al. 1952). Seine Wirkung liegt in der Verhinderung der Erregungsausbreitung vom Krankheitsherd (antispreading effect). Sedative Nebenwirkungen sind nicht bekannt.

Mephénytoin wirkt gegen Pentetrazol- und Elektroschock-Krämpfe, zeigt aber sedative Nebenwirkung.

Die Oxazolindione waren die ersten brauchbaren Medikamente gegen Petit mal. In Tierversuchen wurde ihre geringe Toxizität gezeigt, wobei Ratten empfindlicher waren als Mäuse (SWINYARD et al. 1952). Sie schützten sowohl vor chemisch als auch vor elektrisch induzierten Krämpfen, aber gegen die letzteren erst in weit höheren Dosen. Die für Mäuse benötigten Dosen lagen um 40 - 50 % höher als bei Ratten (SWINYARD et al. 1952, WITHROW et al. 1968). Auch die Succinimide werden gegen Petit mal eingesetzt. Ihre Nebenwirkungen sind schwächer als bei den Oxazolindionen. Der antikonvulsive Effekt von Acetylhamstoffen bewies, daß das charakteristische Ringsystem der meisten Antiepileptika für die Schutzwirkung nicht entscheidend ist. Das bekannteste Mittel dieser Gruppe, Phenacemid, wirkt gegen alle Epilepsieformen, ist aber wegen seiner Leber- und Knochenmarkschädigungen gefährlich.

A = Grand mal B = Psychomot. E. C = Petit mal	N a m e	Indi- kation	R ₁	R ₂	R ₃	X	Grundformel
I. Barbiturate	Phenobarbital	A	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	H	-CO-NH-	
	Mephobarbital	A	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	"	
	Primidon ¹⁾	A, B	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	H	"	
II. Hydantoine	Diphenylhydantoin	A, B	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	H	-NH-	
	Mephentyoin	A, B	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	"	
III. Oxazolidindione	Trimethadion	C	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-O-	
	Paramethadion	C	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	"	
IV. Succinimide	Phensuccimid	C	C ₆ H ₅	H	CH ₃	-CH ₂ -	
	Mesuccimid	C	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	"	
	Ethosuccimid	C	C ₂ H ₅	CH ₃	H	"	
V. Acetylarnstoffe	Phenacemid	B(A+C)	C ₆ H ₅	H, H	H	-NH ₂	

Tab. 1 : Übersicht über die gebräuchlichsten Antiepileptika

¹⁾ Der Carbonylsauerstoff des Harnstoffanteils von Phenobarbital wird durch 2 H-Atome ersetzt.

2. Spezielle Pharmakologie von Trimethadion

Trimethadion (3,5,5-Trimethyl-2,4-oxazolidindion=TMO) ist eine weiße, kristalline, wasserlösliche und kampferartig riechende Substanz, die bei 44 - 46°C schmilzt (BUTLER et al. 1952).

Die Wirkung von Trimethadion beruht auf einem ausgeprägten Antagonismus gegen Modellkrämpfe mit Pentetrazol und der Eigenschaft, die Petit mal - Epilepsie des Menschen unter Kontrolle zu bringen und das dabei krankhaft veränderte EEG zu normalisieren (GOODMAN et al. 1946, SWINYARD 1949).

Der Zeitpunkt der maximalen antikonvulsiven Wirkung von Trimethadion liegt bei der Maus bei einer Stunde bzw. bei 1,5 Stunden bei der Ratte.

Bei subkutaner Verabreichung von Trimethadion an Mäuse bestimmten SWINYARD und Mitarbeiter (1952) nach einer Stunde eine ED_{50} von 480 mg/kg gegen subkutan gegebenes Pentetrazol. Von FREY (1969) bei der Maus durchgeführte Untersuchungen führten zu einer intravenösen $^{1h}ED_{50}$ von 370 mg/kg Trimethadion gegen Pentetrazol (s.c.). Die ED_{50} bei oraler Behandlung mit Trimethadion liegt nach BARNES und ELTHERINGTON (1964) bei 400 bzw. nach eigenen Untersuchungen bei 470 mg/kg.

Die für die Maus ermittelte ED_{50} beim maximalen Elektroschock beträgt 650 mg/kg, während für den minimalen Elektroschock 600 mg/kg Trimethadion benötigt wurden (SWINYARD et al. 1952).

Für Ratten lagen die Schutzdosen nach den Ergebnissen von SWINYARD und Mitarbeiter (1952) um durchschnittlich 40 - 50 % niedriger. Letztgenannte Autoren fanden für die Maus eine neurotoxische Dosis von 650 mg/kg, während bei der Ratte bereits 450 mg/kg toxisch wirkten. Die LD_{50} (Dosis letalis) geben RICHARDS und EVERETT (1946), bei intravenöser Injektion von Trimethadion, mit 2000 mg/kg an; bei i.p. bzw. bei oraler Verabreichung wurden 1800 bzw. 2200 mg/kg benötigt (BARNES und ELTHERINGTON 1964).

Die Angriffspunkte von Trimethadion liegen im ZNS. An Spinalkatzen wiesen ESPLIN und CURTO (1957) nach, daß Trimethadion die polysynaptische Reizübertragung hemmt ohne auf monosynaptische Bahnen einzuwirken. Außerdem

verlängerte es die synaptische Erholungsphase. Im Gegensatz zu Diphenylhydantoin hatte Trimethadion keinen Einfluß auf die posttetanische Potenzierung.

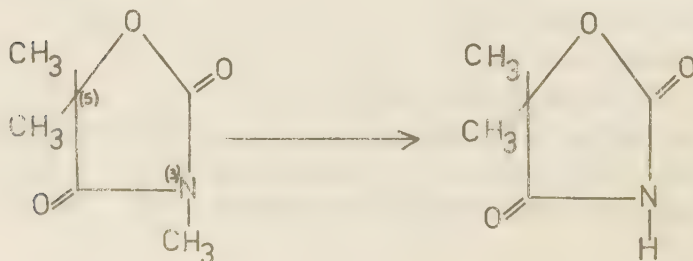
Nach SCHALLEK und KUEHN (1963) hebt Trimethadion die Krampfschwelle im zentrolateralen Nucleus des Thalamus der Katze schon mit geringeren Dosen an als in anderen Gebieten. Auf den dorsomedialen Nucleus, auf die Hirnrinde und den Hippocampus hatte es keinen Einfluß. Diese ausgeprägte Lokalisierung wurde von anderen Autoren bestritten, da Krampfschwellenerhöhungen in der gesamten Großhirnrinde festgestellt wurden. Somit kann nur eine erhöhte Empfindlichkeit des Thalamus bestehen.

Die biochemischen Vorgänge sind nur teilweise bekannt. BOSE und Mitarbeiter (1958) wiesen Senkungen des Acetylcholinpiegels nach. RADOUCO-THOMAS und FROMMEL (1955) zeigten bei in vitro durchgeführten Versuchen mit Einzeldosen, daß Trimethadion keinen Einfluß auf die Cholinesteraseaktivität hat.

Trimethadion wird schnell resorbiert. TAYLOR und BERTCHER (1952) wiesen an Mäusen und Kaninchen nach, daß subkutane Trimethadiongaben bereits nach 15 min. größtenteils resorbiert waren. Mit der ungenauen manometrischen Bestimmungsmethode stellten dieselben Autoren fest, daß Trimethadion in allen Körperflüssigkeiten vorkommt.

Von FREY und SCHULZ (1970) gaschromatographisch durchgeführte Bestimmungen im Serum von Hunden ergaben, daß bereits 1 - 3 Stunden nach oralen Einzeldosen von 90 - 110 mg/kg Trimethadion die Maximalkonzentrationen im Serum erreicht wurden.

Durch spektrophotometrische Untersuchungen des Harns von Hunden wurde bewiesen, daß Trimethadion zu Dimethadion (5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidindion=DMO) abgebaut wird (BUTLER und MAHAFFEE 1952).



Die Halbwertszeiten für die Demethylierung von Trimethadion betragen nach FREY und SCHULZ (1970) bei i.v. behandelten Mäusen und Hunden 46 min. bzw. 8 Stunden. Im Gegensatz zu diesen kurzen Halbwertszeiten lagen die von Dimethadion mit 30 Stunden bei der Maus bzw. 50 - 80 Stunden beim Hund entschieden höher. Bei täglichen oralen Gaben von 20 - 60 mg/kg erreichten Hunde nach 7 Tagen ein Plateau bei Konzentrationen von 180 - 400 mg/l Dimethadion. Dabei blieb der Anteil von Trimethadion an der antikonvulsiven Gesamtwirkung vom 3. Tag an bis zum Versuchsende etwa konstant und erreichte vor der Applikation 2 - 5 % und zum Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration 12 - 15 % (FREY und SCHULZ 1970).

Der starke Abfall der Demethylierungsrate bei Ratten, die vorher mit Trimethadion behandelt und partiell hepatektomiert wurden, weist direkt darauf hin, daß Enzyme der Lebermikrosomen die Abspaltung des Alkylrestes ($-CH_3$) am Stickstoff vornehmen (BUTLER und WADDELL 1953). Dagegen hatte die bilaterale Nephrektomie keinen signifikanten Einfluß auf den Abbau (SWIN-YARD et al. 1952).

WITHROW und Mitarbeiter (1968) zeigten an Ratten und Mäusen, daß bei wiederholter Gabe von Trimethadion die demethylierenden Enzyme in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden.

TAYLOR und BERTCHER (1952) sind der Ansicht, daß auch die Darmmukosa von Ratten am Abbau beteiligt ist. Sie konnten allerdings ihre Annahme nicht experimentell absichern, da Reaktionen von Trimethadion mit Enzymen des Darmes negativ verliefen.

Nach FREY und SCHULZ (1970) beträgt das Verteilungsvolumen von Trimethadion beim Hund 90 und bei der Maus 60 %, das von Dimethadion bei beiden Tierarten 40 % (BUTLER 1953), (FREY 1969), (FREY und SCHULZ 1970).

TAYLOR (1956) erwähnte zuerst die unterschiedliche antikonvulsive Wirkung von Trimethadion und Metabolit. Die von WITHROW und Mitarbeiter (1968) aufgestellte ED_{50} (bei i.p. Injektion von Trimethadion und Dimethadion)

für den maximalen Elektroschock ergab, daß für den Metaboliten nahezu doppelt so hohe Dosen benötigt wurden. Daraus entnahm man, daß Dimethadion nur eine schwache antikonvulsive Wirkung zukommen kann. FREY (1969) dagegen errechnete mit Hilfe der i.v. ED_{50} von Trimethadion und Dimethadion im Pentetrazol-Seizure-Threshold-Test und gleichzeitigen Bestimmungen von Dimethadion im Serum, daß Trimethadion (auf molarer Basis) nur 1,25 mal wirksamer ist als sein Metabolit. CHAMBERLIN und Mitarbeiter (1965) hatten mit Trimethadion-Behandlungen denselben klinischen Effekt wie mit äquivalenten Dimethadion-Dosen.

Die renale Ausscheidung erstreckt sich über viele Tage, wobei die tägliche Ausscheidungsrate von Dimethadion bei 6 - 7 % liegt (BUTLER 1952, JENSEN 1962, CHAMBERLIN et al. 1965).

BUTLER und WADDELL (1957) erforschten die Bedeutung von Harn-pH und Diurese auf die Dimethadion-Clearance von Menschen, die mit Trimethadion behandelt wurden. Die Dimethadion-Clearance stieg deutlich mit erhöhtem Harn-pH. Die Ergebnisse von JENSEN (1962) zeigen, daß die Ausscheidungsraten von Dimethadion bei verschiedenen Patienten differieren, während beim einzelnen recht konstante Werte vorliegen. Außerdem konnte er durch Änderung der Säuerung des Harns die Ausscheidungsraten beeinflussen. Nebenwirkungen bleiben bei chronischer Behandlung mit Trimethadion selten aus. Bei kontrollierter Behandlung und rechtzeitigem Absetzen des Medikamentes können Schäden weitgehend vermieden werden. Veränderungen seitens des Knochenmarks stehen im Vordergrund, wobei Leukopenien, Thrombopenien und Fälle mit aplastischer Anämie bekannt wurden (LÜLLMANN 1962). Charakterveränderungen, Schlaflosigkeit, Erregbarkeit, Stupor und Wechsel von Petit mal - zu Grand mal-Anfällen sind ebenfalls beschrieben worden.

JENSEN (1962) sowie CHAMBERLIN und Mitarbeiter (1965) sahen des öfteren Patienten mit Photophobie (auch mit Verminderung der Sehschärfe) und Mydriasis. Auch Hautkrankheiten (Dermatitis exfoliata und Erythema multiforme, TOMAN 1970), Leberentzündungen und Nierenschäden mit Hämaturie und Albuminurie (CHAMBERLIN et al. 1965) traten auf.

3. Pharmakologische Modelle zur Prüfung antikonvulsiver Wirkungen

Die Epilepsie ist als selbständige Krankheit beim Tier bisher noch nicht nachgewiesen worden und nur symptomatisch ähnliche Formen (z.B. durch Verletzungen und Encephalitiden) sind bisher bekannt. Deshalb war es zur Prüfung der Wirksamkeit von Antikonvulsiva im Experiment wichtig, ein Syndrom auszulösen, das die menschliche Epilepsie weitgehend nachahmt.

Die der Epilepsie am ähnlichsten verlaufenden Krankheitsbilder werden durch intracorticale Injektionen bestimmter Alkalimetalle erreicht. Nachteilig sind die erst nach 6 Wochen beginnenden Krämpfe mit chronischem Verlauf (PETSCHKE 1962). Durch chirurgische Hirnläsionen, Inzucht bestimmter Ratten- und Mäusestämme und durch Schallreize können ebenfalls Krämpfe hervorgerufen werden (BEVAN 1955, STUMPF 1962). Die durch Applikation von Stromstößen und nach Injektion von zentralerregenden Mitteln erzeugten motorischen Krämpfe gelten als beste Äquivalente zum epileptischen Anfall.

Die elektrischen Ströme können beim Versuchstier Krämpfe auslösen, die dem Grand mal des Menschen ähneln. Dabei werden mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtete Cornealelektroden mit Wechselströmen von 50 - 60 Hz und einer Reizdauer von 0,2 sec (GOODMAN et al. 1949) auf die Augen von Ratten oder Mäusen gelegt. Je nach Stromstärke unterscheidet man zwischen Minimalkrämpfen (= Electroshock Seizure Threshold Test; Mäuse: 6 - 9mA / Ratten: 30 mA) und Maximalkrämpfen (= Maximal Electroshock Seizure Pattern Test; Mäuse 50mA / Ratten: 150mA). Während der Schwellenstrom für den minimalen Krampf nur zu klonischen Krämpfen der Kopf- und Vorderextremitätenmuskulatur führt (Dauer etwa 7 sec), kann man beim maximalen Krampf eine kurze Latenzzeit, eine tonische Krampfphase mit Flexion (für 4 sec) und anschließender Extension der Hinterextremitäten (für 6 sec; typisches Merkmal), eine intermittierende klonische Phase des ganzen Körpers (5 sec) und die Muskelschlaffung mit darauffolgendem Koma (5 sec) unterscheiden.

Beim minimalen Elektroschock gilt die Zu- oder Abnahme der Krampfempfindlichkeit durch Änderung der Schwellenstromstärke als Kriterium für die antikonvulsive Wirkung eines Medikamentes, beim maximalen Elektroschock dagegen die Verhinderung der tonischen Extensionsphase.

Die Herabsetzung der extrazellulären Na^+ -Ionenkonzentration (durch i.p. Injektion isotoner Glukoselösung) bewirkt eine gesteigerte Krampfempfindlichkeit. Auf diese Weise kann die Schwelle für den minimalen Krampf experimentell gesenkt werden (Hyponatremic Electroshock Seizure Threshold Test nach SWINYARD 1949 b).

Die chemisch induzierten Krämpfe werden hauptsächlich mit Pentetrazol erzeugt und als Modell für Petit mal benutzt.

Man unterscheidet zwischen dem Maximalkrampf test (Maximal Metrazol Seizure Pattern Test) und dem Schwellenkrampf test (Metrazol Seizure Threshold Test). Beim Maximalkrampf test handelt es sich um tonisch-klonische Krämpfe, die durch intravenöse Injektion der ED_{97} von 38 mg/kg Pentetrazol ausgelöst werden (GOODMAN et al. 1953 a); beim Krampfschwellentest dagegen wird durch subkutane Verabreichung der ED_{97} von 85 mg/kg ein minimaler klonischer Krampf hervorgerufen (SWINYARD et al. 1952).

Als Maßstab für die Wirksamkeit der Antikonvulsiva gelten beim Maximalkrampf die Aufhebung der Streckkrämpfe der Hinterextremitäten und beim Schwellenkrampf die Aufhebung der klonischen Krämpfe.

Nach SWINYARD et al. (1952) eignen sich Ratten am besten für den maximalen Elektroschock, während der Schwellenstromkrampf test und der Pentetrazolkrampf test meist bei der Maus angewendet wird.

C. Eigene Versuche

1. Methodik

Die Experimente wurden an männlichen und weiblichen Mäusen vom NMRI-Stamm (gezüchtet von Møllegaard Hansens Avlslaboratorier A/S, LI, Skensved, Denmark) mit einem Gewicht von 20 - 25 g durchgeführt.

Die Tiere kamen nicht vor 3 Tagen nach dem Eintreffen in den Versuch. Sie wurden mit pelletiertem Altromin-R-10 gefüttert.

a) Krampftest mit Pentylenetetrazol

Zur Bestimmung der antikonvulsiven Wirkung von Trimethadion und Dimethadion wurde der Pentetrazolkrampf-Test (Metrazol Seizure Threshold Test) nach SWINYARD et al. (1952) durchgeführt. Allen Versuchsgruppen wurde nach Ablauf der Versuchszeit 120 mg/kg Pentylenetetrazol s.c. gegeben. In Vorversuchen war dieser Wert als die Dosis ermittelt worden, die bei 95 % der nicht vorbehandelten Mäuse innerhalb von 30 min. einen vollausgebildeten allgemeinen klonischen Krampf mit Verlust der Körperstellreflexe erwarten läßt (Mortalität 70 %).

Zur Beobachtung während des Krampfes wurden Gruppen zu 10 Tieren, nach Geschlechtern getrennt, in Makrolon-Käfige (Typ 2) gesetzt. Ungeschützte Mäuse zeigten vor dem Krampf erhöhte Unruhe, wobei der Rücken gekrümmt und die Schwanzstellung ähnlich wie beim Straub'schen Phänomen war. Nach initialen Zuckungen und klonischen Krämpfen endete der Anfall mit intensiver tonischer Phase. Dabei lagen die Tiere auf der Seite, die Vorder- und Hinterextremitäten wurden nach caudal gestreckt und der Kopf nach ventral gebeugt. Oft konnte man Urinabgabe und vermehrte Speichelbildung beobachten. Die Krämpfe dauerten wenige Sekunden bis zu mehreren Minuten und wiederholten sich in Intervallen von 1 - 4 min. Überlebende Tiere waren stark ermattet und zeigten längere Zeit noch verstärkte Reaktionen auf Umweltreize. In den Versuchen mit Trimerhadion und Dimethadion galten

diejenigen Tiere als geschützt, die innerhalb von 30 min. nach Pentetrazol-Injektion keinen vollausgebildeten allgemeinen klonischen Krampf zeigten. Die von Krämpfen befallenen Mäuse wurden aus der Versuchsgruppe entfernt, um nicht störend auf die anderen Tiere zu wirken.

b) Akute ED₅₀ - Bestimmung

Zur Bestimmung der akuten ED₅₀ wurde Trimethadion in Dosen von 300 - 700 mg/kg oral mit der Knopfkanüle an je 5 Männchen und 5 Weibchen gegeben. Das Injektionsvolumen betrug 10 ml/kg. Eine Stunde post injectionem wurde der Pentetrazol-Test durchgeführt.

Einer Versuchsgruppe wurde 400 mg/kg Dimethadion in die Schwanzvene gespritzt und direkt anschließend 120 mg/kg Pentetrazol s.c. gegeben. Die 5 Versuchstiere, die innerhalb der 30 min. einen vollausgebildeten klonischen Krampf zeigten, wurden sofort danach getötet und für 2 Dimethadion-Bestimmungen im Serum entblutet. Die 5 geschützten Mäuse wurden nach der Beobachtungszeit getötet und das Blut für 2 weitere Bestimmungen im Serum benutzt.

Die ED₅₀ wurde nach der graphischen Methode von LITCHFIELD und WILCOXON (1949) bestimmt.

c) Dauerversuche

Bei den Dauerversuchen wurde Trimethadion mit dem Trinkwasser in den gebräuchlichen 250 ccm-Plastikflaschen mit abnehmbarer, durchbohrter Metallkappe an Gruppen von je 10 männlichen und 10 weiblichen Mäusen gereicht. Die Tiere konnten auf den Hinterbeinen stehend durch Lecken oder Saugen an der abgerundeten Spitze der Flasche trinken, ohne dabei Wasser unkontrolliert zu verschwenden. Lösungen bis zu einer Konzentration von 2 % wurden zunächst von den Mäusen anstandslos aufgenommen.

Die Trinkwasserkonzentrationen variierten von 0,5 - 2,0 %. Die Versuchsdauer betrug 6, 12 und 24 Stunden, sowie 2, 4 und 7 Tage. Den Abschluß jedes Versuches bildete der Pentetrazolkrampf-Test.

Mit Hilfe des täglich aufgenommenen Trinkwassers und des Gewichtes der Mäuse wurde die pro Tag und Maus aufgenommene Menge Trimethadion in g/kg bestimmt.

In einer weiteren Versuchsserie erhielten Mäuse eine 0,5%ige TMO-Lösung mit dem Trinkwasser über 1, 4 und 7 Tage. Nach Entnahme der Trinkflaschen erhielten die Tiere zusätzliche orale Dosen von Trimethadion. Unmittelbar im Anschluß an diese Behandlung wurde die akute orale 1 h ED₅₀ für Trimethadion im Pentetrazol-Test bestimmt.

d) Versuche zur Bestimmung der Serumkonzentration von Trimethadion und Dimethadion

Trimethadion wurde gaschromatographisch mit dem VARIAN AEROGRAPH 1200 (HY-FY Modell, mit Hochtemperatur-Flammenionisationsdetektor) nach der Methode von FREY und SCHULZ (1970) bestimmt.

Die Trennung der Substanzen fand mit einer 2 m langen Glassäule statt, die einen Innendurchmesser von 1,7 mm hatte und mit Chromosorb WAW + 10 % Carbowachs 6000 gefüllt war. Als Trägergas diente Stickstoff, der eine Strömungsgeschwindigkeit von 25 - 27 ml/min. hatte. Die Temperatur des Injektors betrug 220° C, die des Säulenofens 140° C und die des Detektors 240° C. Die Strömungsgeschwindigkeit im Detektor betrug für Wasserstoff 25 ml/min. und für die synthetische Luft 250 ml/min. Der Flächenschreiber drehte sich mit einer Geschwindigkeit von 1 m/h.

Für die Bestimmung von Trimethadion wurden Serumproben von 5 µl direkt in den Injektor gespritzt. Dabei betrug die Retentionszeit 90 sec. Der auf dem Chromatogramm abgebildete Peak ist durch eine schmale Basis charakterisiert. Zwischen der Fläche unter dem Peak und der Konzentration der Probe kann eine lineare Beziehung hergestellt werden. Dabei ist das Produkt aus

der Höhe des Peaks über der Basislinie mal der Halbwertsbreite (Breite des Peaks in 50 % der Höhe) ein Maß für die Dimethadionkonzentration.

Bei der Abschwächung von 32, ergaben 66 Kontrollinjektionen von 0,25 µg - die einer Konzentration von 50 µg/ml entsprechen - eine durchschnittliche Fläche von 290 mm². Bei entsprechender Wahl der Abschwächung können Serumkonzentrationen zwischen 5 und 500 µg/ml bestimmt werden.

Jede Bestimmung wurde dreifach gemacht.

Die Bestimmung von Dimethadion wurde mit Hilfe der UV-Spektrophotometrie nach BUTLER (1953) durchgeführt. Dazu wurden 0,2 - 0,5 ml Serum mit 4 ml 1,5 M NaH₂PO₄-Lösung versetzt, mit 25 ml gewaschenem Äther 5 min. lang ausgeschüttelt und anschließend kurz zentrifugiert. 20 ml der Ätherphase wurden mit 5 ml Boratpuffer (pH 9 und mit Äther gesättigt) 5 min. reextrahiert, zentrifugiert und die Ätherphase abgesaugt. Die zurückbleibende Wasserphase wurde bei den Wellenlängen 215 nm und 220 nm gegen Boratpuffer gemessen. Die Extinktionsdifferenz bei diesen beiden Wellenlängen wurde als Maß für die Dimethadion-Konzentration benutzt und um die durchschnittliche Extinktionsdifferenz von Leerseren (0,04) korrigiert.

Für diese Versuche wurden je 12 Männchen und 12 Weibchen entweder mit der ¹HED₅₀ oral behandelt oder mit einer 0,5%igen TMO-Trinkwasserlösung für den Zeitabschnitt von 6 Stunden bis 7 Tagen versorgt. Eine einzige Versuchsgruppe erhielt eine 1,0%ige Lösung über 24 Stunden. Nach Versuchsende erfolgte die Tötung und Entblutung durch Dekapitation. Um eine Berührung der Blutprobe mit Trimethadion, das möglicherweise noch in der Speiseröhre zurückgeblieben war, zu vermeiden, wurden die Trinkwasserflaschen 30 min. vor Tötung der Mäuse entfernt. Das Blut von 4 gleichgeschlechtlichen Mäusen wurde für eine Serumprobe vereinigt, so daß für jeden Versuch 6 Bestimmungen durchgeführt werden konnten.

2. Ergebnisse

a) Akute Versuche

Die akute ED_{50} gegen 120 mg/kg Pentetrazol, eine Stunde nach oraler Applikation von Trimethadion, betrug 470 mg/kg (400 - 550). Die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Serumkonzentrationen lagen bei $380 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ Trimethadion und $160 \pm 22 \mu\text{g/ml}$ Dimethadion. Berücksichtigt man die gegenüber Dimethadion 1,13 mal stärkere antikonvulsive Wirkung von Trimethadion (FREY 1969), so entfällt auf das applizierte Pharmakon ein Wirkungsanteil von 72,5 %, während auf den Metaboliten nur 27,5 % entfallen.

Von 10 mit 400 mg/kg Dimethadion i.v. behandelten Mäusen waren 5 gegen Pentetrazol-Krämpfe geschützt. Die innerhalb von 30 min. mit Krämpfen befallenen Tiere hatten Serumkonzentrationen von 622 bzw. 703 $\mu\text{g/ml}$ Dimethadion. Die Blutproben der geschützten Mäuse enthielten 676 bzw. 720 $\mu\text{g/ml}$.

b) Versuche mit laufender Zufuhr von Trimethadion über das Trinkwasser

Wie die Versuchsergebnisse in Tabelle 2 zeigen, war die Wirkstoffaufnahme bei 0,5 % und 1,0 % Trimethadion im Trinkwasser der Expositionsdauer von 6, 12 und 24 Stunden korreliert. Bei Konzentrationen von 1,5 und 2 % dagegen lag die aufgenommene Dosis für 12 Stunden nicht höher (1,5 %) oder sogar niedriger (2 %) als im 6 h - Versuch. Da die Mäuse meist teilnahmslos in ihren Käfigen lagen, besteht die Annahme, daß die Tiere nur in den ersten Stunden tranken und dann so stark depressiv beeinflusst waren, daß sie über längere Zeit nichts mehr aufnahmen.

Dauerten die Versuche länger als einen Tag, so verringerte sich die täglich aufgenommene Wirkstoffmenge (Tab. 3).

Bezüglich der Trimethadionaufnahme bestand kein eindeutiger Geschlechtsunterschied.

Die Dauerbehandlung über 2 bis 7 Tage führte bei der Maus zu den folgenden Symptomen: Verminderte Vitalität, gekrümmte Körperhaltung beim Laufen, gestäubte Haare und glanzlose Augen. Auch erhöhte Gewichtsverluste traten auf. In jeder 7 Tage-Gruppe starb am letzten Versuchstag ein Tier, das 25 % seines ursprünglichen Körpergewichtes verloren hatte.

Zeit	Trimethadion-Konzentration in %									
	0,5		0,7		1,0		1,5		2,0	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
6 h	0,16	0,21	-	-	0,46	0,38	0,70	0,71	1,15	1,0
12 h	0,40	0,33	-	-	0,65	0,66	0,68	0,74	0,75	0,71
24 h	0,77	0,57	0,97	0,94	1,02	0,84	1,50	2,10	1,58	1,93

Tab. 2 : Aufgenommene Trimethadion-Menge in g/kg

Tage		1	2	3	4	5	6	7	Gesamt- aufnahme in g/kg
0,5 %ige Lösung	♂	1,34	1,01						2,45
	♀	0,97	0,73						1,70
	♂	0,82	0,62	0,63	0,58				2,65
	♀	0,91	0,62	0,57	0,59				2,69
	♂	0,83	0,71	0,62	0,42	0,62	0,62	0,59	4,41
	♀	0,57	0,53	0,55	0,54	0,57	0,57	0,74	4,07
1,0 %ige Lösung	♂	0,89	0,58						1,47
	♀	0,82	0,64						1,46
	♂	0,91	0,71	0,39	0,34				2,35
	♀	0,71	0,67	0,39	0,54				2,31

Tab. 3 : Täglich aufgenommene Trimethadion-Menge in g/kg

Tabelle 4 zeigt die antikonvulsive Wirkung der Trimethadion-Behandlungen in diesen Versuchen:

Mit Trinkwasserkonzentrationen von 0,5 % konnte bei 6- und 12 h - Versuchen kein Schutzeffekt erzielt werden. Konzentrationen von 1,0 bzw. 1,5 % führten bei den genannten Versuchszeiten zu einer maximalen Schutzwirkung von 15 bzw. 20 %. Bei höher konzentrierter Lösung war der antikonvulsive Effekt sogar niedriger. Während nach 6 Stunden 2%ige Lösungen noch 10 % der Mäuse schützten, waren es nach 12 Stunden nur noch 5 %.

Mäuse, die 24 Stunden im Versuch blieben, zeigten die deutlichsten Schutzeffekte. Dabei war die antikonvulsive Wirkung der Konzentration im Trinkwasser proportional. Es konnte eine $ED_{50} = 1,55 \text{ g/kg}$ extrapoliert werden.

Über den Zeitraum von 24 Stunden hinausgehende Versuche führten bei Konzentrationen von 0,5 % über 2 und 4 Tage zu einem Schutz von 20 % bzw. nach 7 Tagen nur noch zu 10 %. Eine höhere Konzentration (1,0 %) schützte keine Mäuse mehr; die hierbei aufgenommene Trimethadion-Menge lag allerdings auch unter derjenigen bei einer Konzentration von 0,5 % im Trinkwasser (Tab. 3).

Trimethadion-Konzentration im Trinkwasser	Dauer der Behandlung in h	Antikonvulsive Wirkung		Schutzwirkung in %
		♂	♀	
0,5 %	6	0/10	0/10	-
	12	0/10	0/10	-
	24	2/10	2/10	20
	48	2/10	2/10	20
	96	2/10	2/10	20
	168	1/10	1/10	10
0,7 %	24	4/10	3/10	35
1,0 %	6	1/10	0/10	5
	12	1/10	2/10	15
	24	5/10	3/10	40
	48	0/10	0/10	-
	96	0/10	0/10	-
1,5 %	6	1/10	1/10	10
	12	2/10	2/10	20
	24	4/10	6/10	50
2,0 %	6	2/10	0/10	10
	12	0/10	1/10	5
	24	3/10	2/10	25

Tab. 4 : Antikonvulsive Wirkung von Trimethadion

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, enthielt das Serum von Mäusen nach 6 Stunden nur noch geringe Mengen der Muttersubstanz. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, daß der größte Teil des Trimethadions innerhalb der ersten Stunden aufgenommen wurde. Es fällt weiterhin auf, daß trotz der gleichen Dimethadion-Serumkonzentrationen der Gruppe mit 0,5 %iger Lösung über 48 Stunden und der Gruppe mit 1 %iger Lösung über 24 Stunden, nach 48 Stunden statt 40 nur noch 20 % der Tiere geschützt waren.

c) Bestimmung der akuten ED_{50} von Trimethadion nach Behandlung
über das Trinkwasser

Da bei Versuchsgruppen mit 0,5 % Trimethadion im Trinkwasser über 24 - 168 Stunden, trotz Dimethadion-Serumkonzentrationen von 700 - 1800 $\mu\text{g/ml}$, deutliche Schutzeffekte ausblieben, wurden Gruppen von 1, 4 und 7 Tagen zusätzlich mit Einzeldosen von 470 - 800 mg/kg behandelt. Wie die Tabelle 6 zeigt, lagen die ED_{50} - Werte von Trimethadion mit 540 - 640 mg/kg etwas oberhalb der akuten ED_{50} .

Akuter Versuch:

Dosis	Serumkonzentration in µg/ml		Wirkungsanteil v. Trimethadion ¹⁾
akute ^{1h} ED ₅₀ oral (470 mg/kg)	160 [±] 22 Dimethadion	380 [±] 20 Trimethadion	72,5 %

Dauerbehandlung:

Trimethadion-Konzentration im Trinkwasser	Dauer der Behand- lung	Serum-Konzentration in µg/ml		Wirkungsanteil v. Trimethadion ¹⁾ in %
		Dimethadion	Trimethadion	
0,5 %	6 h	200 [±] 19	17,0 [±] 7,3	8,8
	12 h	450 [±] 54	12,0 [±] 3,0	2,9
	24 h	670 [±] 68	17,5 [±] 6,7	2,9
	48 h	1250 [±] 110	21,0 [±] 3,2	1,9
	96 h	1600 [±] 100	17,5 [±] 0,8	1,2
	168 h	1800 [±] 180	27,0 [±] 3,3	1,7
1,0 %	24 h	1250 [±] 150	34,0 [±] 4,8	3,0

Tab. 5: Konzentration an Trimethadion und Dimethadion im Serum

¹⁾ Berechnet mit Hilfe des von FREY (1969) bestimmten gewichtsmäßigen Wirkungsverhältnisses (Trimethadion = 1,13 x Dimethadion)

Dauer- behandlung	akut mg/kg	Schutz- wirkung in %	ED ₅₀ (mg/kg)
0,5 % für 1 Tag	470	40	540 (391-745)
	600	65	
	800	90	
0,5 % für 4 Tage	470	30	640 (538-761)
	600	45	
	700	55	
	800	74	
0,5 % für 7 Tage	470	35	600 (491-732)
	700	60	
	800	70	

Tab. 6 : Antikonvulsive Wirkung von Trimethadion bei gleichzeitiger chronischer und akuter Behandlung

D. Diskussion der Ergebnisse

In den vorliegenden Untersuchungen sollte versucht werden, an Mäusen durch laufende Zufuhr von Trimethadion mit dem Trinkwasser eine Situation zu schaffen, die derjenigen unter der klinischen Therapie besser entsprach als die pharmakologisch übliche Bestimmung der ED_{50} . Während nämlich im akuten Versuch das unveränderte Trimethadion gegenüber seinem Metaboliten die Hauptrolle spielt, liegen die Verhältnisse bei Dauerzufuhr gerade umgekehrt: Es kommt zu einer ausgeprägten Kumulation des Metaboliten Dimethadion, während dem unveränderten Trimethadion aufgrund seiner raschen Demethylierung nur ein prozentual geringer Wirkungsanteil zukommt (JENSEN 1962, CHAMBERLIN et al. 1965, FREY und SCHULZ 1970).

Im akuten Versuch erwiesen sich Mäuse als zu 50 % geschützt bei einer Serumkonzentration von 380 $\mu\text{g/ml}$ Trimethadion und 160 $\mu\text{g/ml}$ Dimethadion (äquivalent etwa 600 $\mu\text{g/ml}$ Dimethadion) bzw. durch Dimethadion-Konzentrationen von 600 - 700 $\mu\text{g/ml}$. Bei einer Behandlungsdauer von 6 und 12 h wurde mit geringen Konzentrationen Trimethadion im Trinkwasser keine für den Krampfschutz ausreichende Gesamtdosis aufgenommen. Bei höheren Trinkwasserkonzentrationen wurden zwar Gesamtdosen bis zu 1 g/kg aufgenommen, die Aufnahme erfolgte aber anscheinend zum größten Teil in den ersten Stunden der Exposition. So fällt in Tab. 2 auf, daß die bei Trimethadion-Konzentrationen von 1,5 und 2 % im Trinkwasser aufgenommene Dosis im 12 h - Versuch nicht höher oder sogar geringer war als im 6 h - Versuch. Nach der Aufnahme so hoher initialer Dosen benötigten die Tiere offenbar eine längere Erholungszeit, ehe sie erneut zu trinken begannen. Die höchste erreichte Krampfschutzwirkung betrug 10 % im 6 - und 20 % im 12 h - Versuch.

Die Konstruktion einer Dosiswirkungskurve war dagegen möglich, wenn der Versuch über 24 h lief: Hier ergab sich eine Abhängigkeit zwischen Trinkwasserkonzentration und antikonvulsiver Wirkung über einen Konzentrationsbereich von 0,5 - 1,5 %, während bei einer Konzentration von 2 % nicht mehr Trimethadion als bei 1,5 % aufgenommen wurde und der Schutzeffekt sogar geringer

war. Aus den Werten dieser Versuchsreihe ließ sich eine EC_{50} von 1,45 % Trimethadion im Trinkwasser, bzw. eine ED_{50} von 1,55 g/kg extrapolieren. Mit einer 1%igen Lösung erwiesen sich 40 % der Mäuse als gegen den Krampf geschützt; mit dieser Konzentration wurde aber bereits eine Serumkonzentration von 1250 µg/ml Dimethadion und von 34 µg/ml Trimethadion erreicht, also etwa das doppelte dessen, was im akuten Versuch einen 50%igen Schutz ergab.

Eine Serumkonzentration von 1250 µg/ml Dimethadion wurde auch nach 48-stündiger Zufuhr von 0,5 % im Trinkwasser erreicht, die Schutzwirkung betrug nun aber nur noch 20 %. Nach 4- bzw. 7-tägiger Verabreichung einer 0,5 %igen Lösung wurden sogar Serumkonzentrationen von 1600 bzw. 1800 µg/ml Dimethadion bestimmt, trotzdem betrug die Schutzwirkung nur 20 bzw. 10 %. Da mit höheren Trinkwasserkonzentrationen in diesen Versuchsreihen keine höhere Wirkstoffaufnahme mehr erreicht werden konnte, ließ sich auch für Behandlungszeiten von 2 - 7 Tagen keine Dosiswirkungskurve aufstellen.

Deshalb wurde bei Mäusen, die 1, 4 oder 7 Tage lang eine Konzentration von 0,5 % Trimethadion mit dem Trinkwasser erhalten hatten, unmittelbar im Anschluß an diese Behandlung die akute ED_{50} - bei oraler Gabe - bestimmt. Die in Tab. 6 zusammengestellten ED_{50} - Werte liegen mit 540 - 640 mg/kg in derselben Größenordnung wie die akute ED_{50} von 470 mg/kg Trimethadion bei nicht vorbehandelten Mäusen, obwohl die Tiere bereits mit Serumkonzentrationen von 700 - 1800 µg/ml in den Versuch gingen.

Diese Resultate lassen sich nur durch die Entwicklung einer Toleranz (Gewöhnung) gegen den antikonvulsiven Effekt von Trimethadion erklären. Ein Vergleich der nach verschiedenen Behandlungszeiten erreichten Serumkonzentrationen mit der entsprechend antikonvulsiven Schutzwirkung läßt erkennen, daß diese Toleranz bereits nach 24-stündiger Behandlung einsetzt und dann bis zu dem längsten geprüften Behandlungszeitraum von 7 Tagen zunimmt. Das Phänomen der Toleranz gegen antikonvulsive Wirkungen, das von FREY und

KAMPMANN (1965) bereits für Phenobarbital und Diphenylhydantoin gezeigt worden war, trifft demnach auch für die Gruppe der Oxazolindione zu. Mit Ethosuccimid waren diese Autoren seinerzeit zu keinem schlüssigen Ergebnis gekommen, weil die Mäuse keine für einen vollständigen Krampfschutz ausreichenden Dosen mit dem Trinkwasser aufnahmen.

Die in Tab. 5 zusammengestellten Serumkonzentrationen von Trimethadion und Dimethadion im akuten Versuch und nach verschieden langer Behandlung über das Trinkwasser lassen erkennen, daß unverändertes Trimethadion nur im akuten 1 h - Versuch einen wesentlichen Anteil an der Gesamtwirkung hat. Bereits nach 6-stündiger Behandlung liegt der wirkungsmäßige Anteil des unveränderten Trimethadion unter 10 % und spätestens von einer Behandlungszeit von 48 h an liegt er unter 2 %. Diese rasche Abnahme des wirkungsmäßigen Anteils war nach den vorausgegangenen Versuchen von FREY und SCHULZ (1970) an Hunden zu erwarten gewesen. Die Tatsache, daß der Anteil des Trimethadion an der antikonvulsiven Wirkung bei der Maus noch niedriger ist als beim Hund, erklärt sich aus der unterschiedlichen Demethylierungsgeschwindigkeit bei beiden Tierarten. Die genannten Autoren bestimmten bei der Maus für die Demethylierung von Trimethadion eine Halbwertszeit von 46 min. gegenüber etwa 8 h beim Hund. Für den Menschen ist eine noch geringere Halbwertszeit für diesen Prozeß zu erwarten und dem entsprechend sollte der Anteil des unveränderten Trimethadion an der antikonvulsiven Gesamtwirkung hier noch etwas höher als die 5 - 15 % beim Hund sein.

Bezüglich der für den Krampfschutz erforderlichen Serumkonzentration von Dimethadion fällt ein gewisser Mangel an Übereinstimmung zwischen Klinik und Tierversuch auf. CHAMBERLIN et al. (1965) und JENSEN (1962) haben an Patienten mit Petit mal gezeigt, daß die Anfälle durch Serumkonzentrationen von 600 - 1000 µg/ml Dimethadion praktisch vollständig unterdrückt werden. Solche Konzentrationen werden frühestens nach 3 bis 5 Behandlungstagen erreicht. Demgegenüber traten in unseren Mäuseversuchen Serumkonzentrationen bis zu 1800 µg/ml auf, ohne daß die Tiere sicher gegen die durch

Pentetrazol ausgelösten Krämpfe geschützt waren.

Die Erklärung für diese Diskrepanz dürfte in dem Unterschied zwischen klinischem Petit mal und seinem pharmakologischen Modell, dem Pentetrazol-Krampf-Test zu suchen sein. Der durch Pentetrazol ausgelöste generalisierte Krampfanfall ist ungleich intensiver als z.B. die für den Petit mal - Anfall typische Absence, und zwar sowohl was das klinische Bild als auch was die Himstromkurve angeht. FREY hat bereits 1964 darauf hingewiesen, daß der Pentetrazolkrampf-Test als Modell für Petit mal weniger gut geeignet ist als z.B. der maximale Elektroschockkrampf-Test als Modell für Grand mal. In diesen Untersuchungen war nämlich gezeigt worden, daß eine Amphetamin-Behandlung, von der klinisch ein synergistischer Effekt zur antikonvulsiven Medikation bekannt ist, bei der Maus einen eindeutigen antagonistischen Effekt gegen die Wirkung von Trimethadion und Ethosuccimid hatte. Auf der anderen Seite haben alle klinisch gegen Petit mal wirksamen Antikonvulsiva auch tierexperimentell eine Wirkung im Pentetrazolkrampf-Test, und man wird diesen Test deshalb bis auf weiteres, trotz gewisser Vorbehalte, als das beste Modell für Petit mal betrachten müssen.

Die Frage, ob es auch beim Menschen eine Toleranz gegen den antikonvulsiven Effekt von Trimethadion bzw. seinem Metaboliten Dimethadion gibt, kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig beantwortet werden, wenn auch einige Indizien für die Existenz einer Toleranz vorliegen. Wenn die im vorausgegangenen Absatz geäußerte Vermutung zutrifft, daß zum Schutz gegen den intensiveren Pentetrazolkrampf höhere Trimethadion- bzw. Dimethadion-Konzentrationen erforderlich sind als zum therapeutischen Effekt gegen Petit mal, so wäre eine Schutzwirkung gegen diese Epilepsieform bei einer Konzentration von beträchtlich weniger als 600 µg/ml Dimethadion-Äquivalenten, welche mit der akuten ED_{50} im Tierversuch erreicht wurde, zu erwarten gewesen. Die Arbeiten von JENSEN (1962) und CHAMBERLIN et al. (1965) geben aber übereinstimmend eine klinische Schutzwirkung erst für Serumkonzentrationen von 1000 - 10000 µg/ml an. Dies läßt den Schluß zu, daß sich auch beim Menschen

eine Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung von Trimethadion entwickelt. Im Gegensatz zum Tierexperiment wird diese Toleranzentwicklung aber durch die Kumulation des Metaboliten Dimethadion so vollständig kompensiert, daß auch bei Dauerbehandlung über längere Zeit der therapeutische Effekt erhalten bleibt.

E. Zusammenfassung

Mit den vorliegenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob Mäuse, die über längere Zeit mit Trimethadion über das Trinkwasser behandelt werden, einen ebenso deutlichen Schutzeffekt gegen Pentetrazol zeigen wie im akuten Experiment.

Die Behandlungsdauer wurde von 6 Stunden bis 7 Tagen variiert.

Im akuten Versuch lag die orale $^{1h}ED_{50}$ bei 470 mg/kg Trimethadion. Mit dieser Dosis wurde eine Serumkonzentration von 380 µg/ml Trimethadion und 160 µg/ml Dimethadion erreicht. Das entspricht einem Anteil von Trimethadion von 72,5 % an der antikonvulsiven Gesamtwirkung.

Bei den Dauerversuchen, die über 6 und 12 Stunden liefen, konnten keine deutlichen Schutzeffekte erreicht werden, da die dafür notwendige Wirkstoffmenge nicht aufgenommen wurde.

Für Mäuse, die 24 Stunden im Versuch blieben, konnte eine ED_{50} von 1,55 g/kg Trimethadion extrapoliert werden. Die dazu benötigte Trinkwasserkonzentration betrug 1,45 %.

Versuchstiere, die über 2, 4 und 7 Tage mit 0,5 % Trimethadion im Trinkwasser behandelt wurden, zeigten, trotz Serumkonzentrationen von 1250 - 1800 µg/ml Dimethadion, nur minimale Schutzeffekte.

In allen Versuchen mit Dauerbehandlung im Trinkwasser lag der wirkungsmäßige Anteil von unverändertem Trimethadion unter 10 %, ab 48 Stunden sogar unter 2 %.

Die Ergebnisse sprechen für die Entwicklung einer Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung von Trimethadion.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Barnes, C.D.,
L.G. Eltherington Drug dosage in laboratory animals.
University of California Press -
Berkely and Los Angeles S. 242, 1964
- 2) Bevan, W. Sound-precipitated convulsions: 1947
to 1954
Psychol. Bull. 52, 473, 1955
- 3) Bose, B.C.,
S.S. Gupta,
S.K. Sharma Effect of anticonvulsant drugs on the
acetylcholine content in rat tissues.
Arch.int.Pharmacodyn. 117, 254-261, 1958
- 4) Butler, Th.C.,
D. Mahaffee,
C. Mahaffee Metabolic demethylation of 3,5,5-trimethyl-
2,4-oxazolidinedione.
Proc.Soc. exp.Biol. (N.Y.) 81, 450-452,
1952
- 5) Butler, Th. C. Quantitative studies of the demethylation
of trimethadione.
J. Pharmacol. exp.Ther. 108, 11 - 17,
1953
- 6) Butler, Th. C.,
W.J. Waddell The role of the liver in the demethylation
of N-methyl-derivatives of hydantoin
and of 2,4 oxazolidinedione.
J. Pharmacol. exp. Ther. 110, 241 - 243,
1953
- 7) Butler, Th. C.,
W.J. Waddell Renal excretion of 5,5-dimethyl-2,4-
oxazolidinedione.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 96, 563 - 565,
1957
- 8) Chamberlin, H.R.,
W.J. Waddell,
Th. C. Butler A study of the product of demethylation of
trimethadione in the control of petit mal
epilepsy.
Neurology (Minneap.) 15, 449 - 454, 1965
- 9) Driesen, G.,
G. Härtfelder Antiepileptica in G. Ehrhart und H. Ruschig
Arzneimittel, Band 1; Pharmakodynamica
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr.,
S. 474 ff, 1968

- 10) Esplin, D.W.,
E.M. Curto Effect of trimethadione on synaptic transmission in the spinal cord; antagonism of trimethadione and pentylenetetrazol.
J.Pharmacol.exp.Ther. 121, 457-467, 1957
- 11) Frey, H.- H. Note on the interactions of amphetamine with anticonvulsant drugs.
Acta pharmacol. (Kbh.) 21, 290-298, 1964
- 12) Frey, H.- H.,
E. Kampmann Tolerance to anticonvulsant drugs.
Acta pharmacol. (Kbh.) 22, 159-171, 1965
- 13) Frey, H.- H. Determination of the anticonvulsant potency of unmetabolized trimethadione.
Acta pharmacol. (Kbh.) 27, 295-300, 1969
- 14) Frey, H.- H.,
R. Schulz Study of the time-course of demethylation of trimethadione to dimethadione.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. Pharmacol. 266, 325, 1970
- 15) Frey, H.- H.,
R. Schulz Time course of the demethylation of trimethadione.
Acta pharmacol. (Kbh.) 28, 477-483, 1970
- 16) Goodman, L.S.,
J.E.P. Toman,
E.A. Swinyard The anticonvulsant properties of tridione.
Amer.J.Med. 1, 214-227, 1946
- 17) Goodman, L.S.,
E.A. Swinyard,
J.E.P. Toman Anticonvulsant drugs: Mechanisms of action and methods of assay.
Arch.int. Pharmacodyn. 78, 144-162, 1949
- 18) Goodman, L.S.
M.S. Grewal,
W.C. Brown,
E.A. Swinyard Comparison of maximal seizure evoked by pentylenetetrazol and electroshock in mice and their modification by anticonvulsants.
J.Pharmacol.exp.Ther. 108, 168-176, 1953a
- 19) Jensen, B.N. Trimethadione in serum of patients with petit mal epilepsy.
Dan. med. Bull. 9, 74-79, 1962
- 20) Litchfield, J.T.,
F.J. Wilcoxon A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharmacol.exp.Ther. 96, 99-113, 1949

- 21) Lüllmann, H. Die Nebenwirkungen der Antiepileptika. Arzneimittel-Forsch. 12, 868-873, 1962
- 22) Mumenthaler, M. Neurologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. S. 235-247, 1969
- 23) Petsche, H. Zentralnervensystem: Neuropathologische Methoden in Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk XVI/7, S. 229-230, Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962
- 24) Radouco-Thomas, C., E. Frommel Médication antiepileptique et activité cholinestérasique. Helv. physiol. pharmacol. Acta 13, 1-13, 1955
- 25) Richards, R.K., G.M. Everett Trimethadione: A new anticonvulsant drug. J. Lab. clin. Med. 31, 1330-1336, 1946
- 26) Schallek, W., A. Kuehn Effects of trimethadione, diphenylhydantoin and chlorthalidoxepoxide on after-discharges in brain of cat. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112, 813-817, 1963
- 27) Stumpf, Ch. Zentralnervensystem: Pharmakologische Methoden in Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk XVI/7, S. 8 ff. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962
- 28) Swinyard, E.A. Effects of extracellular electrolyte depletion on brain electrolyte pattern and electroshock seizure threshold. Amer. J. Physiol. 156, 163-169, 1949b
- 29) Swinyard, E.A. Laboratory assay of clinically effective antiepileptic drugs. J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed. 38, 201 - 204, 1949

- 30) Swinyard, E.A.,
D.O. Schiffman,
L.S. Goodman Effects of liver injury and nephrectomy on
the anticonvulsant activity of oxazolidine-
2,4-diones.
J.Pharmacol.exp.Ther. 105, 365-370, 1952
- 31) Swinyard, E.A.,
W.C. Brown,
L.S. Goodman Comparative assays of antiepileptic drugs
in mice and rats.
J.Pharmacol.exp.Ther. 106, 319-330, 1952
- 32) Taylor, J.D.,
E.L. Bertcher The deter mination and distribution of
trimethadione in animal tissues.
J.Pharmacol.exp.Ther. 106, 277-285, 1952
- 33) Taylor, J.D. Duration of anticonvulsant action of trime-
thadione and some demethylated oxazolidine-
diones against pentylenetetrazol in mice.
Fed. Proc. 15, 491, 1956
- 34) Toman, J.E.P. Drugs effective in convulsive disorders in
L.S. Goodman and A. Gilman: The Phar-
macological Basis of Therapeutics.
The Macmillan Company, 4th Ed., 1970,
S. 204 - 221
- 35) Withrow, C.D.,
R.J. Strout,
L.J. Barton,
W.S. Beacham
D.M. Woodbury Anticonvulsant effects of 5,5-dimethyl-2,4-
oxazolidine-dione.
J.Pharmacol.exp.Ther. 161, 335-341, 1968
- 36) Woodbury, D.M.,
J.W. Kemp Some possible mechanisms of action of anti-
epileptic drugs.
Pharmakopsychiatr. 3, 201 - 226, 1970

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.- H. Frey für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Eberhard Manz danke ich für die Unterstützung bei der Bestimmung von Trimethadion im Serum.

Trimethadion und Dimethadion wurden dankenswerterweise von den Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

LEBENS LAUF

Am 23. Dezember 1943 wurde ich, Bernd-Harald Kretschmer, als Sohn des Regierungsangestellten Ewald Kretschmer und seiner Ehefrau Alma, geb. Griesbach, in Kolberg/Pommern geboren.

Im Jahre 1951 wurde ich in die 11. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf eingeschult. Nach sechs Volksschuljahren besuchte ich das Walther-Rathenau-Gymnasium in Berlin-Grunewald, auf dem ich am 18. Februar 1965 die Reifeprüfung bestand.

Am 15. Juni 1965 wurde ich zum Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin zugelassen. Nach neunsemestrigem Studium schloß ich am 26. Februar 1970 mein Staatsexamen ab. Am 29. April 1970 wurde mir die Approbation erteilt.

Seit 1. April 1970 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie der Freien Universität Berlin beschäftigt.

